

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 12 月 31 日 (31.12.2003)

PCT

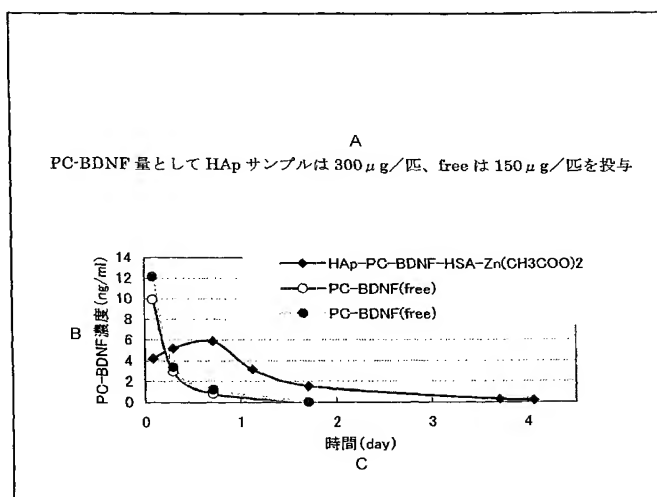
(10) 国際公開番号
WO 2004/000270 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 9/06, 9/08, 47/02, 47/36, 47/42 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007251 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水島 裕 (MIZUSHIMA, Yutaka) [JP/JP]; 〒154-0022 東京都世田谷区梅丘 1 丁目 1 番 1 1 号 Tokyo (JP). 高木 幸江 (TAKAGI, Yukie) [JP/JP]; 〒214-0035 神奈川県川崎市多摩区長沢 4-3-2 Kanagawa (JP). 羽木 智美 (HAGI, Tomomi) [JP/JP]; 〒236-0032 神奈川県横浜市金沢区六浦町 1 3 4 7-7 Kanagawa (JP). 生駒 俊之 (IKOMA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-1 4-5-B 2 0 1 Ibaraki (JP).
(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 9 日 (09.06.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 2002-179788 2002 年 6 月 20 日 (20.06.2002) JP (74) 代理人: 高橋 剛, 外 (TAKAHASHI, Takeshi et al.); 〒103-0027 東京都中央区日本橋 3 丁目 6 番 1 0 号 マスチビル 3 F Tokyo (JP).
特願 2002-374173 2002 年 12 月 25 日 (25.12.2002) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ムック (MOOK CO., LTD.) [JP/JP]; 〒105-6201 東京都港区愛宕二丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP). (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: SUSTAINED-RELEASE COMPOSITION, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: 徐放性組成物、その製造方法およびその製剤



A...IN TERMS OF THE AMT. OF PC-BDNF, HAp SAMPLE WAS ADMINISTERED
IN AN AMT. OF 300 μ g/EACH AND FREE IN AN AMT. OF 150 μ g/EACH
B...CONCENTRATION OF PC-BDNF (ng/ml)
C...TIME

(57) Abstract: A sustained-release composition capable of exerting sustained-release effects for a prolonged period of time by injection of fine particles thereof in an amount causing no pain, the injection easily performed, for example, under the human skin or intramuscularly. The sustained-release composition is obtained by filling pores of porous hydroxyapatite fine particles with a biologically active drug, a human serum protein and mucopolysaccharide and obturating the filled particles by adding a divalent metal ion. Also, the sustained-release composition is obtained by filling pores of porous hydroxyapatite fine particles with a biologically active drug, a human serum protein and a water-soluble calcium salt in sequence or simultaneously and obturating the outer layer of the fine particles by adding sodium carbonate or sodium hydrogen carbonate or an aqueous carbonate ion solution.

[続葉有]

WO 2004/000270 A1



ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 人の皮下または筋肉内などに容易にしかも苦痛を起こさない量の同微粒子の注射で、長期にわたって徐放効果が得られる徐放性組成物を提供すること。多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填し、2価金属イオンを加えることにより栓塞したことからなる。又、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、該微粒子の外層を栓塞してなる。

明細書

徐放性組成物、その製造方法およびその製剤

技術分野

本発明は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子含有徐放性組成物、その製造法およびその製剤に関し、詳しくは栓塞処理したハイドロキシアパタイト微粒子含有徐放性組成物、その製造法およびその製剤さらには皮膚用徐放性組成物に関する。

背景技術

注射用徐放製剤は、再生医療への応用もでき、最近その重要性が増している。これまで無機・有機微粒子やカプセル、ハイドロゲルなどによる徐放性製剤が開発されている。水溶性薬物の長期間にわたる徐放性注射剤は、これまでポリ乳酸・グリコール酸（PLGA）を基剤にしてその多くは検討されてきた（特開平11-286403，特開2000-239104，特開2002-326960）。又、ヒト成長ホルモン（hGH）を含有する PLGA を基剤とした徐放性マイクロカプセルが報告されている（Nature Medicine, 2: 795-799, 1996）。又、LHRH アゴニストであるリュープロレリンを含有する PLGA を基剤とした徐放性マイクロカプセルが報告されている（Chemical Pharmaceutical Bulletin, 36: 1095-1103, 1988）。PLGA は生体内で加水分解して消失する生体内消化性の基剤で注射剤の基剤としては好ましい性質を有している。しかし、一般的に PLGA を使用する徐放性製剤を製造する際には、それを溶解する有機溶剤を使用するが、hGH は、有機溶剤中で変性し、一部が失活する。このような活性の低下は、有効性を損なうのみならず、生体にもわるい影響をもたらす危険性がある。さらに、hGH は、水溶性が高く、PLGA 製剤を用いると投与初期に過剰な放出をすることは避けられない。その他、ハイドロゲルなどの使用が報告されているが通常の注射投与は困難である。すなわち、ゲルが注入可能となる太い針を使用しなければならず、患者にとって好ましいものではない。また、ヒドロキシアパタイトと生物活性薬剤であるヒト成長

ホルモンを用いた徐放性粒子についてすでに報告はある（H. Gautier et al: Journal of Biomedical Material Research, 40, 606-613, 1998、J. Guicheux et al: Journal of Biomedical Material Research, 34, 165-170, 1997）。しかし、いずれも2成分系であり、アパタイトの粒子径も40から80 μm あるいは200 μm と大きくそのため注射するのが困難であり、又、in vivoにおける徐放効果は不明である。又、アパタイト粒子に吸着したhGH量（封入量）も1%以下と小さいものであった。

さらに、前記徐放性製剤には、バーストが起こるものがあり、器質化してバイオアベイラビリティがかなり落ちるものがあり、生体内で完全に分解されないものなどがあり、かつ超徐放が期待できないなど、いずれかの点で問題点があった。

そこで、本発明者らは、これらの問題点を解決するために、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子のナノの空間を栓塞する徐放製剤の作製を試みた。まず、ハイドロキシアパタイトは生体反応性が少ないため、現在までの検討では、器質化がなく、焼き方によるが2～5週間で皮下で完全に溶解し、バイオアベイラビリティも良く、バーストも起こらず、そして、栓塞併用でかなりの徐放効果が得られることを発見した。

そこで、本発明は、人の皮下または筋肉内に容易にしかも苦痛を起こさない量の同微粒子の注射で、長期にわたって徐放効果が得られる徐放性組成物、その製造法、その製剤及び皮膚用徐放性組成物を提供することを目的とする。

発明の開示

前記目的を達成するため、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤（高分子、低分子医薬品）、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填し、2価金属イオンを加えることにより栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、それに2価金属イオン溶液を入れ、微粒子

全体を栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質を充填し、2価金属イオンを加えることにより該微粒子の外層に栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、該微粒子の外層を栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、該微粒子全体を栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、微粒子の外層を栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面にハイドロキシアパタイトと特に結合性の高い生物活性薬剤を結合させてなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に生物活性薬剤を結合させ更に2価金属イオンを加えることにより栓塞してなるものである。

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に2価金属イオンを結合させ更に生物活性薬剤を加えることにより栓塞してなるものである。

又、本発明の皮膚用徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に皮膚疾患治療薬剤または日焼け止めなどの医薬部外品を基材とともに充填し

、これを軟膏、クリーム、ローションと混和してなるものである。

この皮膚用徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に充填されているので適切な量が皮膚に塗布される。そこで、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子から徐々に有効な成分が徐放されることになり、かつ多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に充填されている皮膚疾患治療薬剤または日焼け止めなどの医薬部外品等の紫外線吸収物質が徐々にしみ出す（即ち、徐放する）ので効果が持続することになる。

本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び 2 価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されるものである。

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び 2 価金属イオン溶液を混合し、分離し、さらにこれを凍結乾燥することにより作製されるものである。

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液を混合し、分離し、これを凍結乾燥後 2 価金属イオン溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されるものである。

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これに炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を混合し、分離して作製されるものである。

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさ

らに凍結乾燥することにより作製されるものである。

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されるものである。

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これに 2 価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されるものである。

さらに、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、2 価金属イオン溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これに生物学的活性薬剤からなる水溶液を混合し、分離して作製されるものである。

前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子がハイドロキシアパタイト懸濁液をスプレードライし、100 ～ 800 °C で焼成したものであることが好適である。800 °C 以上だと細孔がつぶれてしまい、100 °C 以下では焼成できないからである。

前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の粒径が 0.1 ～ 20 μm であることが好適である。

前記生物学的活性薬剤の徐放性組成物中の含量が少なくとも 0.01 重量%であることが好適である。

前記ヒト血清タンパク質がヒト血清アルブミンあるいは γ -グロブリンであることが好適である。

前記ヒト血清タンパク質の徐放性組成物中の含量が少なくとも 1 重量%であることが好適である。

前記 2 価金属イオンが亜鉛イオン、銅イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンであることが好適である。

前記 2 価金属イオンの徐放性組成物中の含量が少なくとも 0.01 重量%であることが好適である。

前記ムコ多糖体がコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン

硫酸、デルマタン硫酸あるいはケラタン硫酸及びそれらの塩、のうち少なくとも 1 種であることが好適である。

前記ムコ多糖体の徐放性組成物中の含量がヒト血清タンパク質の 1/100 以上であることが好適である。

前記徐放性組成物が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布などに適した形態であることが好適である。

又、本発明の徐放性製剤は、前記の組成物に、必要に応じて製剤学的に受容可能な添加物を加えたことからなることが好適である。

前記製剤学的に受容可能な添加物が界面活性剤、防腐剤、又は安定化剤であることが好適である。

前記製剤が凍結乾燥されたものであることが好適である。

前記製剤が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布などに適した形態であることが好適である。

前記水溶性のカルシウム塩が塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウムであることが好適である。

さらに、本発明の特徴を下記に記載する。

本発明は外層栓塞と全層栓塞とからなっている。いずれの栓塞方法の場合でも、まず主薬を単独又は栓塞に使用する物質や安定剤とともに、多孔性ハイドロキシアパタイトの細孔に入れ、沈殿を生じさせる物質すなわち 2 価金属イオンや炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより上記組成物を沈殿させることによって栓塞をつくる。或いは 2 価金属イオンを多孔性ハイドロキシアパタイトの細孔に入れ、次いで生物学的活性薬剤の水溶液を加えること、又、生物学的活性薬剤の水溶液を多孔性ハイドロキシアパタイトの細孔に入れ、次いで 2 価金属イオン溶液を加えることにより栓塞を形成させる。外層のみを栓塞する場合は組成物により内部の細孔を充填させた後、沈殿化物質を加える。全層を栓塞させる場合は、組成物の入った微粒子を一度凍結乾燥し、細孔に空気を入れ、沈殿化物が微粒子の内部にまで浸透することにより全層を栓塞することが出来る、ということである。

なお、a) 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の大きさ、間隙のサイズと

量、適切な焼成温度は何度か、b) 外層栓塞法の時、亜鉛塩、炭酸ナトリウムのみを最後に加えていること、又、医薬品、タンパク、ムコ多糖体は、混合液として充填した方が良いか、順次加えた方が良いか、c) 全体を栓塞する場合、凍結乾燥は完全にする方が良いか中等度が良いか、d) 医薬品は臨床上、必要量封入するとし、タンパク/ムコ多糖体/亜鉛などの最適比、e) ムコ多糖体としてはコンドロイチン硫酸で良いか、f) 薬物の性質によっては、2価金属イオンのみで栓塞が可能であるなど、個々の医薬品によって異なる。

図面の簡単な説明

図1は、d d y マウスにおける PC-BDNF-HAp 製剤投与後の PC-BDNF の血中濃度の推移を示す図である。

図2は、IFN α -HAp 製剤投与後 d d y マウス IFN α 血中濃度の推移を示す図である。

図3は、Zn 濃度が IFN-HAp 製剤の徐放に与える影響を示す図である。

図4は、栓塞の有・無による G-CSF の HAp への結合の違いを示す図である。

図5は、in vitro における医薬品溶出結果を示す図である。

図6は、焼成温度の違いによる生体内溶解性の比較を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例について記述する。

(実施例 1)

180 °Cで焼成した多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子 (HAp) 20mg に 4.54mg/ml の PC-BDNF (レシチン化 BDNF) 溶液を 66 μ l 加え、ボルテックスにて 1 分間攪拌し、それに 0.1 % HSA 溶液を 434 μ l 加え、再び 1 分間攪拌した。それらを 3 分間静置させてから 1000rpm、3 分間の遠心をかけ、上清を回収し、沈渣に 5mM Zn(CH₃COO)₂ /5% Mannitol 溶液を 500 μ l 加え、攪拌しサンプルを調製した。コントロールとして 4.54mg/ml の PC-BDNF 溶液を 66 μ l と 5 % Mannitol を 434 μ l とを混和させたサンプルも調製した。

。これらを 6 週齢雄 ddy マウスの皮下に $500 \mu\text{l}$ 投与し、投与後、2、7、17 時間、1、2、4 日後に眼窩採血を行い、PC-BDNF の血中濃度を ELISA KIT (Promega) にて測定を行った。その結果すぐれた徐放効果が得られた。この結果を図 1 に示した。

(実施例 2)

$225 \mu\text{g/ml}$ IFN α (インターフェロン α , 住友製薬) 0.854ml と 20mg/ml HSA 1.2ml を混合し、タンパク混合液を調製した。 180°C で焼成した HAp 200mg にタンパク混合液 0.856ml を混和し攪拌してタンパクを HAp に封入させた。これに 20mg/ml コンドロイチン硫酸 (CS, WAKO) 0.05ml 、 H_2O 0.074ml 、 $1\text{M Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0.02ml を順に加えた。 15000rpm , 5min. の遠心を行い、沈渣に $20\text{mM Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ / 5% Mannitol 溶液を 2ml 加えてサンプルとした。

コントロールは、IFN α 入りタンパク混合液 0.856ml に H_2O 0.644ml 、 20% Mannitol 0.5ml 加えて、これを IFN α (free) の溶液とした。

8 週齢雄の ddy マウス (体重 $33 \sim 40\text{g}$, SLC) に上記で調整したサンプルを 0.5ml 皮下投与した。投与 4 時間後、1 ~ 10 日後までマウスから眼窩採血を行い、血液を採取した。この血液の IFN α 血中濃度を ELISA KIT (Biosource 社) にて測定、血中薬物動態を図 2 に示した。結果、すぐれた徐放効果が得られた。

(実施例 3)

0.937mg/ml IFN α 0.06ml と 20mg/ml HSA 0.3ml 、 20mg/ml CS 0.03ml 、 H_2O 1.22ml を混合し、この溶液に 180°C で焼成した HAp 200mg を作用させた。攪拌によりタンパクを HAp に封入させた後、 H_2O 10ml を加え、軽く攪拌し、 3000rpm , 5min. で遠心をした。沈渣を凍結乾燥して、2 等分した。一方には $20\text{mM Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ / 5% Mannitol 溶液を 1ml 、他方には $5\text{mM Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ / 5% Mannitol 溶液 1ml を加えた。

コントロールとして、 0.937mg/ml IFN α 0.015ml 、 20mg/ml HSA 0.075ml

、H₂O 0.66ml、20% Mannitol 0.25ml 加えて、IFN α (free) の溶液として調整した。

7 週齢雄の ddy マウス(体重 31 ~ 33g,SLC)に上記で調整したサンプルを 0.7ml 皮下投与した。投与 4 時間後、1 ~ 7 日後までマウスから眼窩採血を行い、血液を採取した。この血液の IFN α 血中濃度を ELISA KIT (Biosource 社)にて測定、血中薬物動態を図 3 に示した。結果、亜鉛が 20mM の場合は、血中濃度の上昇は不十分であったが著しく長期にわたって徐放を示した。一方、亜鉛が 5mM の場合は、血中濃度の上昇は良いが比較的すみやかに血中濃度は低下した。

(実施例 4)

180 °Cで焼成した HAp50mg に予め混和しておいた G-CSF、HSA、CaCl₂ 溶液 (3 μ g、30 μ g、280mg/ml) を 100 μ l 加え、ボルテックスにて 3 分間攪拌し、5 分間静置させ、凍結乾燥した。得られた粒子に 220mg/ml の Na₂CO₃ 溶液を 100 μ l 加え、ボルテックスにて 3 分間攪拌し、さらに水 100 μ l を加え、軽く攪拌した。一部を ELISA 測定用に採取し、残りを 1000rpm、3 分間の遠心をかけ、上清を回収、沈渣に PBS 2ml を加えて、室温で軽く振とうし、0 時間、0.5 時間後にそれぞれ上清を回収した。さらにその沈渣に PBS 10 ml を加えて室温で振とうし、0 時間、0.5 時間後にそれぞれ上清を回収、最後の沈渣と途中で得られた上清を ELISA KIT (IBL) により測定した。最後の沈渣は 1% BSA/Tris-HCl (pH5) にて溶解し、ELISA 測定用とした。この結果を図 4-A に示した。また、HAp 50mg に 1.5 μ g/ml の G-CSF 溶液を 200 μ l 加え、多孔を充填し、さらに PBS を 2 ml 加え、同様に放出試験を行った結果を図 4-B に示した。このように栓塞技術により放出は著しく抑えられた。

(実施例 5)

180 °Cで焼成した HAp50mg に 100mg/ml の SOD 溶液を 10 μ l または 40mg/ml の PC-SOD (レシチン化 SOD) 溶液を 25 μ l 加え、ボルテックスにて 1 分間攪拌し、それに水を 990 μ l または 975 μ l 加え、再び 1 分間攪拌し

た。それらを 3 分間静置させてから 1000rpm、3 分間の遠心をかけ、上清を回収し、沈渣に水 2ml を加え攪拌し、1000rpm、3 分間の遠心をかけ、上清を回収、さらにその沈渣に PBS 2ml を加え攪拌し、1000rpm、3 分の遠心をかけ、上清を回収した。これで得られた沈渣に PBS 1ml を加えて室温で振とうし、0 時間、1 時間後にそれぞれ上清を回収し、上清と最後の沈渣は BCA assay (PIERCE) により測定した。その結果を図 5 に示した。このように化学修飾により、HAp への吸着量が増す蛋白がある。

(実施例 6)

凍結乾燥品と 180 °C、800 °C で焼成した HAp 24mg に 5% Mannitol を 6ml 加えボルテックスで 1 分間攪拌し、HAp 溶液を調整した。13 週齢雄の Wistar ラット(体重 330.400g, SLC)の背中 3 ケ所に、それぞれの HAp 溶液を、投与した場所が重ならないように 500 μ l ずつ投与した。これらを 2 時間、4,7,11,14,18,21 日後に背中を切開し、HAp の残存量を写真で撮影した。後日、数名により写真にて、おおよその残存量を目で評価した。その結果、HAp はいずれもほぼ 2 ~ 3 週で消失するが焼成温度が高いほど消失しにくかった。この結果を図 6 に示した。

(実施例 7) 亜鉛を介した G-CSF のヒドロキシアパタイトへの吸着

40 mg のヒドロキシアパタイト粒子を G-CSF 溶液 (100 μ g/ml) 100 μ l 中に 10 分間浸した後 900 μ l の精製水を加え攪拌、遠心分離後上清をすて、再度精製水で沈殿を攪拌し遠心分離することによって過剰の G-CSF を除去した。沈殿を pH 4 の酢酸緩衝液に懸濁し、G-CSF を溶出させ遠心分離後上清の G-CSF 量を ELISA で測定し G-CSF の吸着量を求めたところ 0.1 μ g 以下とほとんど吸着がみられなかった。

そこで以下の様な操作で亜鉛をヒドロキシアパタイト粒子に吸着させその粒子へ G-CSF 吸着を試みた。10mg のヒドロキシアパタイトを 200 μ l の酢酸亜鉛 (5mg/ml) に懸濁、10 分間室温に放置後 10,000rpm で 10 分間遠心分離、上清を捨てた。沈殿を 500 μ l の精製水で懸濁し、10 分間室温に放置後 10,000rpm

で 10 分間遠心分離、上清を捨てた。再度、懸濁、遠心分離後、上清を捨てた。この沈殿を 0.5ml の 200 μ g/ml あるいは 1000 μ g/ml の G-CSF 溶液中に懸濁し、10 分間放置後 10,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清の G-CSF 量を ELISA 法で測定した。さらに沈殿を 0.1MEDTA、1 % HAS 溶液でヒドロキシアパタイトに含まれる G-CSF を溶出させ、遠心分離後上清の G-CSF 濃度を ELISA 法で測定しヒドロキシアパタイトへの吸着量を求めた。

表 1 に示すようにあらかじめヒドロキシアパタイトを亜鉛塩で処理することによって 10mg のヒドロキシアパタイトに添加した G-CSF の 80.0 ~ 86.4% が吸着した。10mg のヒドロキシアパタイトに最大 400 μ g の G-CSF を吸着させることができた。

表 1 亜鉛を結合させたヒドロキシアパタイト (10mg) への G-CSF の吸着量

ヒドロキシアパタイト量 (mg)	G-CSF 全量 (μ g)	G-CSF 非吸着量 (μ g)	G-CSF 吸着量 (μ g)
10	100	0.4	86.4
10	500	90.0	400.0

(実施例 8)

多孔性ヒドロキシアパタイト (HAP) を 45mg 精秤し、それにインターフェロン- α (IFN) の 2.4mg/ml 溶液から IFN として 30 μ g を加え、10 分間放置した。その後、これに 20mM/1ml の酢酸亜鉛溶液を 1ml 加え、30 分間振とうした。この分散液に 1.5ml の水を加え、洗浄して洗浄液中 IFN を定量したところ、IFN は検出されなかった。すなわち、全ての IFN は HAP に吸着していることが確認された。このように、有機溶媒を使用しないでタンパク質である IFN を吸着した微粒子製剤をえることができた。洗浄後得られた粉末に 20%FCS 含有の PBS 溶液 20ml を加え、37 $^{\circ}$ C で 16 時間振とうした。上清に溶出してきた IFN を定量して溶出率を算出した。表 2 に示す結果が得られた。

表 2 HAP に吸着した IFN の溶出率

			溶出した IFN(%)
HAP	酢酸亜鉛	0mM	92
	酢酸亜鉛	20mM	87

酢酸亜鉛の添加によって溶出は抑制され、無添加に比較してより長時間にわたる徐放性を示した。

請求の範囲

1 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填し、2 価金属イオンを加えることにより栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

2 前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子がハイドロキシアパタイト懸濁液をスプレードライし、100 ～ 800 °C で焼成したものであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の徐放性組成物。

3 前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の粒径が 0.1 ～ 20 μm であることを特徴とする請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の徐放性組成物。

4 前記生物学的活性薬剤の徐放性組成物中の含量が少なくとも 0.01 重量%であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の徐放性組成物。

5 前記ヒト血清タンパク質がヒト血清アルブミンあるいは γ -グロブリンであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の徐放性組成物。

6 前記ヒト血清タンパク質の徐放性組成物中の含量が少なくとも 1 重量%であることを特徴とする請求の範囲第 1 項又は第 5 項記載の徐放性組成物。

7 前記 2 価金属イオンが亜鉛イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の徐放性組成物。

8 前記 2 価金属イオンの徐放性組成物中の含量が少なくとも 0.01 重量%であることを特徴とする請求の範囲第 1 項又は第 6 項記載の徐放性組成物。

9 前記ムコ多糖体がコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸あるいはケラタン硫酸及びそれらの塩、のうち少なくとも 1 種であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の徐放性組成物。

10 前記ムコ多糖体の徐放性組成物中の含量がヒト血清タンパク質の 1/100 以上であることを特徴とする請求の範囲第 1 項又は第 9 項記載の徐放性組成物。

11 前記徐放性組成物が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布に適した形態であることを特徴とする請求の範囲第 1 項から請求の範囲第 10 項のいずれかに記載の徐放性組成物。

1 2 前記請求の範囲第 1 項記載の組成物に、必要に応じて製剤学的に受容可能な添加物を加えたことからなることを特徴とする徐放性製剤。

1 3 前記製剤学的に受容可能な添加物が界面活性剤、防腐剤、又は安定化剤であることを特徴とする請求の範囲第 1 2 項記載の製剤。

1 4 前記請求の範囲第 1 2 項記載の製剤が凍結乾燥されたものであることを特徴とする製剤。

1 5 前記製剤が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布に適した形態であることを特徴とする請求の範囲第 1 2 項から請求の範囲第 1 4 項のいずれかに記載の製剤。

1 6 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、それに 2 価金属イオン溶液を入れ、微粒子全体を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

1 7 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質を充填し、2 価金属イオンを加えることにより該微粒子の外層に栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

1 8 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより該微粒子の外層を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

1 9 前記水溶性のカルシウム塩が塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウムであることを特徴とする請求の範囲第 1 8 項記載の徐放性組成物。

2 0 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、微粒子全体を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

2 1 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、微粒子の外層を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

2 2 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面にハイドロキシアパタイトと特に結合性の高い生物学的活性薬剤を結合させてなることを特徴とする徐放性組成物。

2 3 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に生物学的活性薬剤を結合させ更に 2 価金属イオンを加えることにより栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

2 4 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に 2 価金属イオンを結合させ更に生物学的活性薬剤を加えることにより栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

2 5 前記 2 価金属イオンが亜鉛イオン、銅イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンであることを特徴とする請求の範囲第 2 3 項又は第 2 4 項記載の徐放性組成物。

2 6 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に皮膚疾患治療薬剤または日焼け止めなどの医薬部外品を基材とともに充填し、これを軟膏、クリーム、ローションと混和してなることを特徴とする皮膚用徐放性組成物。

2 7 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び 2 価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

2 8 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び 2 価金属イオン溶液を混合し、分離し、さらにこれを凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

2 9 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これにムコ多

糖類水溶液を混合し、分離し、これを凍結乾燥後 2 価金属イオン溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

3 0 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これに炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

3 1 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

3 2 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

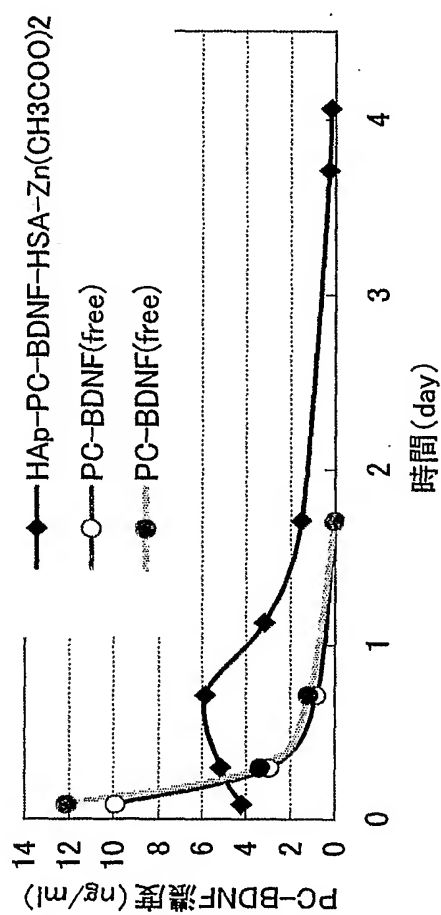
3 3 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤からなる水溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これに 2 価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

3 4 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、2 価金属イオン溶液を混和、攪拌して懸濁液を製し、これに生物学的活性薬剤からなる水溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

1 / 6

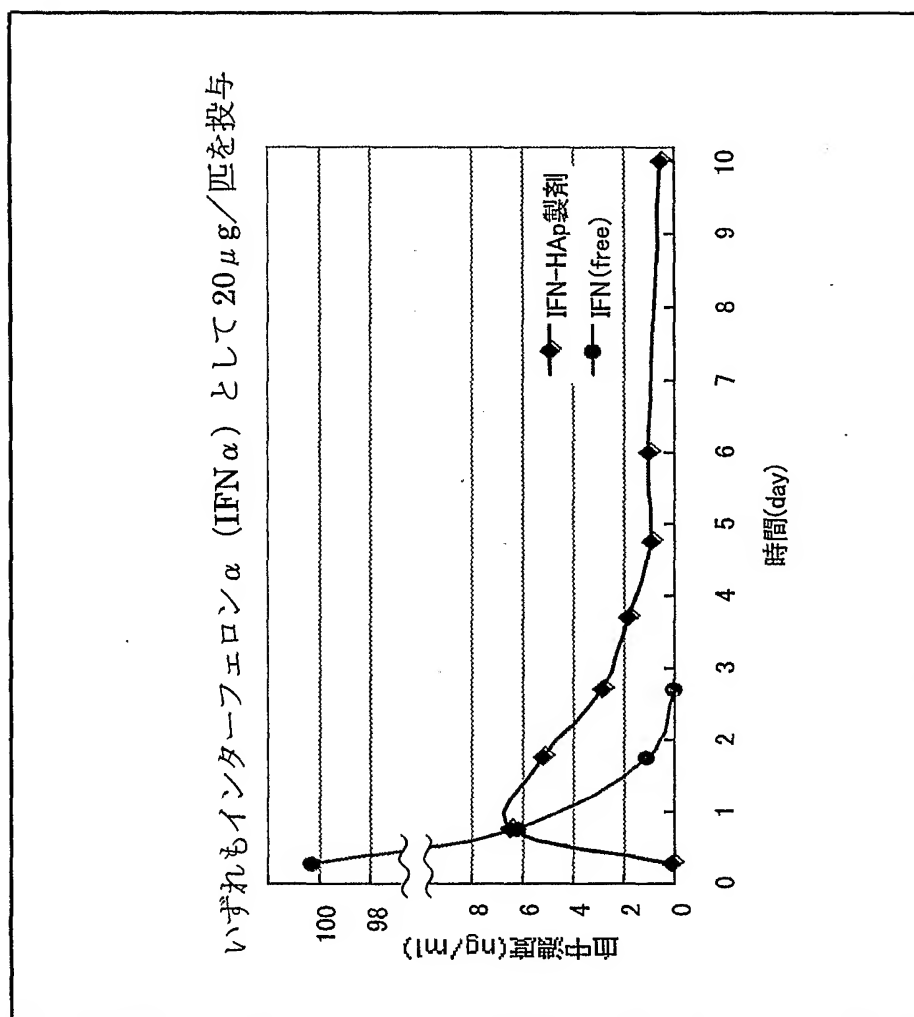
図 1

PC-BDNF 量として HAp サンプルは $300 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、free は $150 \mu\text{g}/\text{匹}$ を投与



2 / 6

図 2



3 / 6

図 3

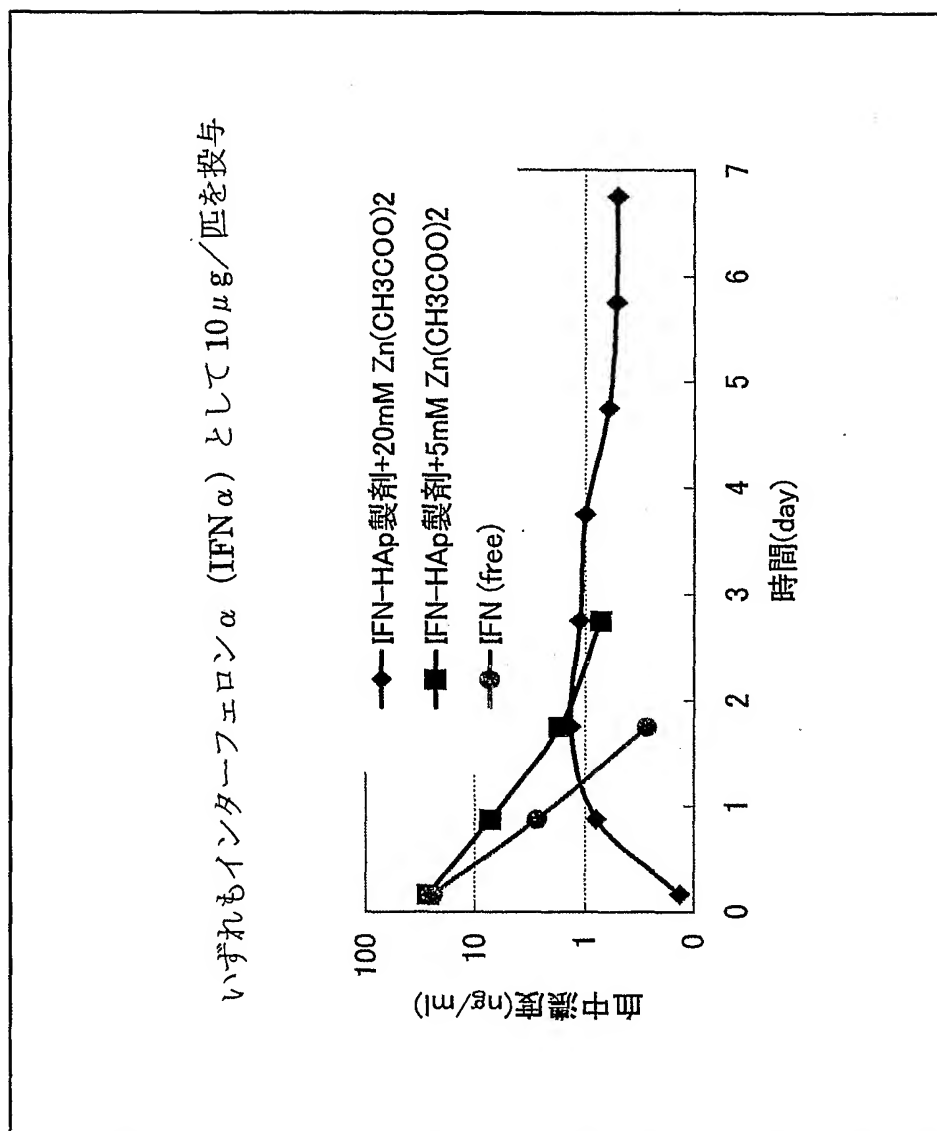
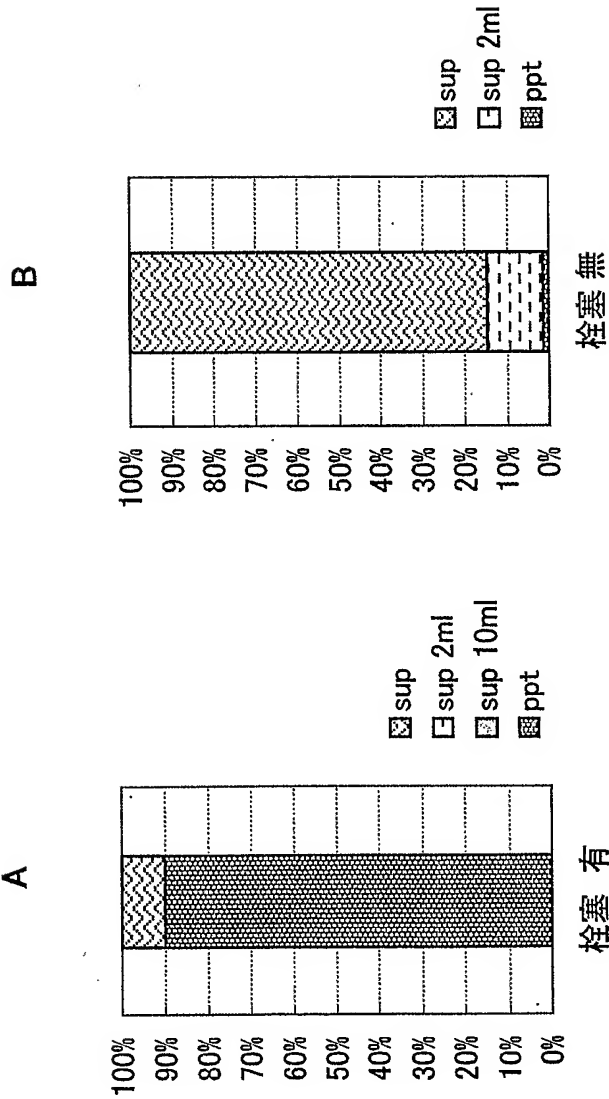
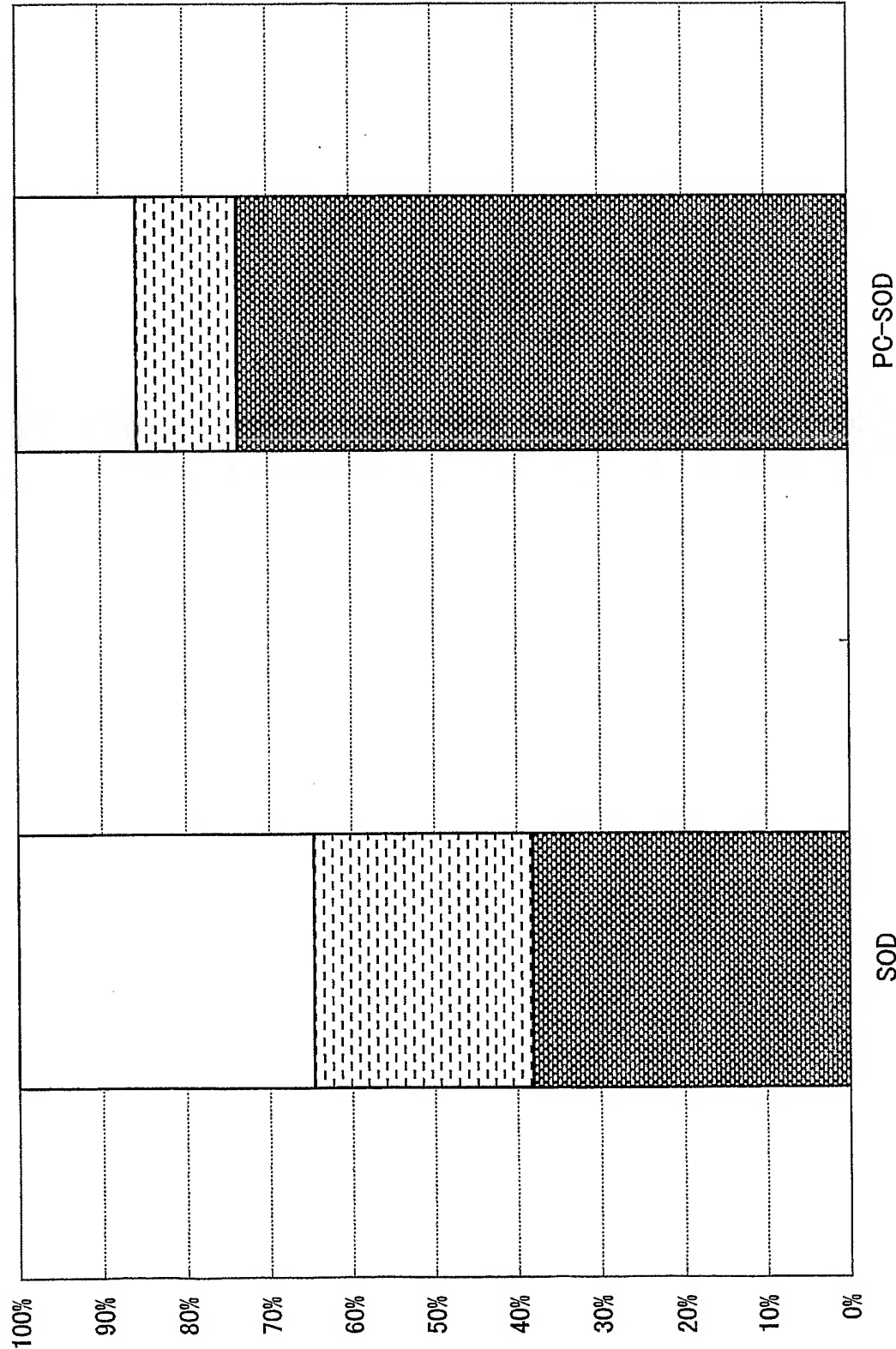


図 4



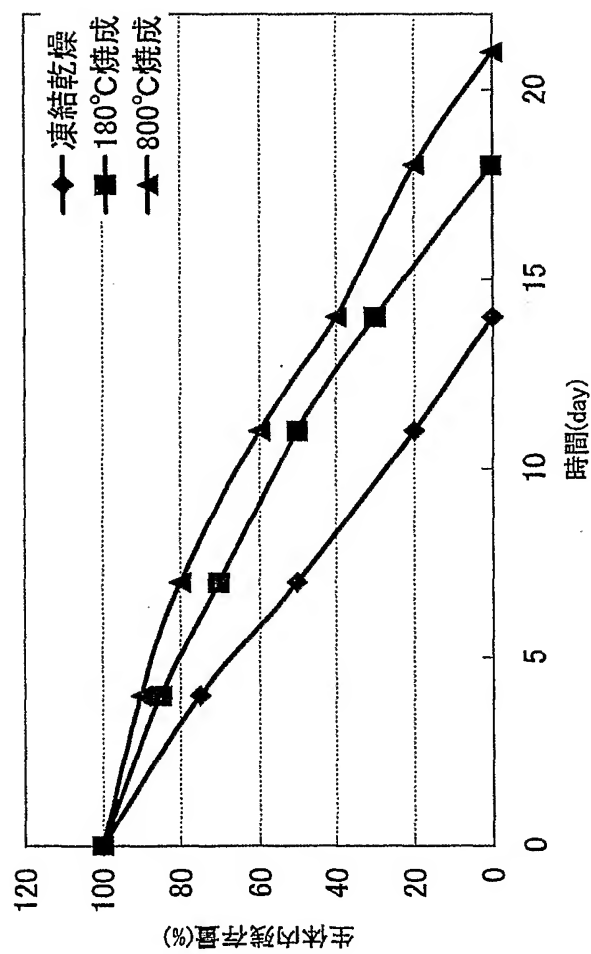
5 / 6
図 5

□ sup 0h
▨ sup 1h
▩ ppt



6 / 6

図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K9/06, A61K9/08, A61K47/02, A61K47/36, A61K47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K9/06, A61K9/08, A61K47/02, A61K47/36, A61K47/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 4-327525 A (Kyocera Corp.), 17 November, 1992 (17.11.92), Claim 1; column 3, line 45 to column 4, line 37 (Family: none)	1-32
Y	EP 0376331 A2 (ASAHI KOGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 04 July, 1990 (04.07.90), Claims 1 to 5; page 4, lines 22 to 30 & JP 3-218310 A & US 5055307 A	1-32
X	JP 9-165327 A (Noboru HARADA, Pola Chemical Industries Inc.), 24 June, 1997 (24.06.97), Claims 1 to 3; column 2, lines 13 to 19; column 4, lines 15 to 25 (Family: none)	33-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 August, 2003 (11.08.03)

Date of mailing of the international search report
26 August, 2003 (26.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K9/06, A61K9/08, A61K47/02, A61K47/36, A61K47/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K9/06, A61K9/08, A61K47/02, A61K47/36, A61K47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1992年
 日本国公開実用新案公報 1971-1992年
 日本国登録実用新案公報 1994-1996年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、MEDLINE (STN)、EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 4-327525 A (京セラ株式会社) 1992. 11. 17, 請求項1, 第3欄第45行-第4欄第37行 (ファミリーなし)	1-32
Y	EP 0376331 A2 (ASAHI KOGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 1990. 07. 04, 請求項1-5, 第4頁第22-30行 & JP 3-218310 A & US 5055307 A	1-32
X	JP 9-165327 A (原田 昇, ポーラ化成工業株式会	33-34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 08. 03

国際調査報告の発送日

26.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

4C

3229

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	社) 1 9 9 7 . 0 6 . 2 4 , 請求項 1 - 3 , 第 2 欄 第 1 3 - 1 9 行 , 第 4 欄 第 1 5 - 2 5 行 (ファミリーなし)	1-32